

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-271193

(43)Date of publication of application : 05.10.1999

(51)Int.Cl.

G01N 1/28
G01N 1/10
// G01N 33/48

(21)Application number : 10-076976

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 25.03.1998

(72)Inventor : YASUDA KENJI
SAKURAI TOMOYA
MAEUCHIHARA NORIE

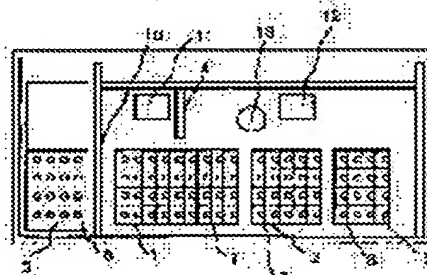
(54) ORGANISM SAMPLE PRETREATING DEVICE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To easily and automatically separate genes and nucleic acid from an organism sample containing the genes and the nucleic acid by dissolving germs and virus in the sample, liberating the pieces of the genes and the nucleic acid, and allowing them to adhere to a solid surface.

SOLUTION: A sample tube 7 for dissolving germs where a reagent is added is retained for a fixed amount of time, and then a sample is moved to a sample tube 8 for extraction by a dispensing nozzle where a disposable breathing filter built-in tip is fitted. A fixed amount of magnetic fine particles being covered with crystal is added to the sample, and further a chaotropic agent is added. A permanent magnet where the magnetic fine particles are installed at a lower portion is raised, is allowed to adhere to the bottom of a tube, and is collected at the bottom of the tube. Then, a washing liquid is dispensed for washing using a dispensing nozzle where a disposable pipet tip is fitted and finally a small

amount of sterilization pure water is added to a sample tube 8, thus dissolving and separating DNA being sucked on the surface of crystal. The dissolved and separated DNA is sucked by a disposable breathing filter built-in tip and is moved to an extraction tube 9 for nucleic acid. The DNA thus obtained is used for each analysis method.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 22.03.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-271193

(43) 公開日 平成11年(1999)10月5日

(51) Int.Cl.⁶
G 0 1 N 1/28
1/10
// G 0 1 N 33/48

識別記号

F I
G 0 1 N 1/28 J
1/10 A
33/48 A

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平10-76976

(22) 出願日 平成10年(1998)3月25日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 保田 健二

茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株
式会社日立製作所計測器事業部内

(72) 発明者 桜井 智也

茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株
式会社日立製作所計測器事業部内

(72) 発明者 前内原 紀江

茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株
式会社日立製作所計測器事業部内

(74) 代理人 弁理士 小川 勝男

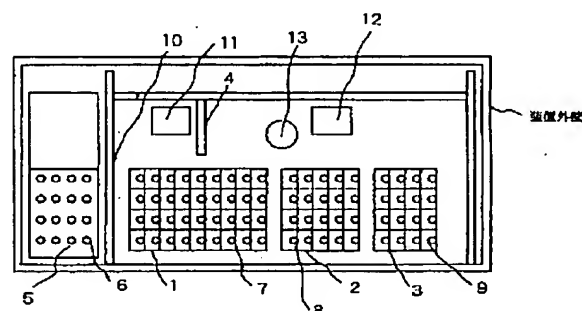
(54) 【発明の名称】 生体試料前処理装置

(57) 【要約】

【課題】 生体試料中の遺伝子や核酸を微生物や細胞から自動的に分離する。

【解決手段】 生体試料を溶菌用試料チューブ7に移し、溶菌工程を行い、抽出用試料チューブ8に転送し、抽出工程を行う。この間の試料の移動を分注アームに組み込まれた分注ノズルで行う。試料チューブはそれぞれ隔壁14でコンタミネーションを低減させるように設置する。

図 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】生体試料中の遺伝子や核酸を、微生物菌体や細胞を破壊して遊離させる第1の工程と、遊離した該遺伝子や該核酸を共存物から分離する第2の工程から成る前処理過程を有する生体試料前処理装置において、第1の工程ののち、試料を隣接した別の区画に移し、第2の工程を行うことにより、該遺伝子や該核酸を試料から分離することを特徴とする生体試料前処理装置。

【請求項2】生体試料が体液であることを特徴とする請求項1記載の生体試料前処理装置。

【請求項3】破壊して遊離させる工程の区画と、遊離した該遺伝子や該核酸を共存物から分離する工程の区画とを隣接させ、各試料容器間を仕切ることの特徴とする請求項1記載の生体試料前処理装置。

【請求項4】試料の破壊に使用した容器と、共存物から分離するための容器とを替えることを特徴とする請求項1記載の生体試料前処理装置。

【請求項5】破壊して遊離させる工程がヒータ加熱、超音波振動、マイクロ波加熱、酵素溶解、界面活性剤溶解のいずれかであることを特徴とする請求項1記載の生体試料前処理装置。

【請求項6】生体試料中の遺伝子や核酸を、微生物菌体や細胞を破壊して遊離させる工程と、遊離した該遺伝子や該核酸を共存物から分離する工程から成る前処理過程を有する生体試料前処理装置において、両者の工程を行う区画が、その実行中空気の流通を遮断する扉によって閉鎖されることを特徴とする請求項1記載の生体試料前処理装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は生体試料の前処理装置に関するものであり、血液や体液中の微量遺伝子や核酸の測定や調製に使用される。前処理の省力化、自動化に関するものである。

【0002】

【従来の技術】核酸や遺伝子を生体試料から抽出することは、遺伝子工学や臨床検査の分野で極めて重要なプロセスである。この場合、生体試料とは、生物(ヒトを含む動物)中の体液、分泌物、組織細胞、浮遊細胞などを意味し、とりわけ血清や血液、髄液、リンパ液、尿などの体液をさす。通常有核遺伝子は細胞の中に他のオルガネラなどに囲まれ、核蛋白質などと結合して存在する。またウイルスや細菌の遺伝子も殻や細胞壁の中に取り込まれている。

【0003】そこで、遺伝子や核酸を他の成分から分離するためには、細胞壁や細胞膜、カプシド蛋白質やエンペローブを破壊ないしは溶解する必要がある。そこで、このためには、一般には超音波や加熱による物理的破壊や、プロテアーゼや界面活性剤による溶解などの手段が用いられている(新生物化学実験のてびき3「核酸の分

離・分析と遺伝子実験法」下西康嗣ほか編、化学同人1996年刊、pp. 1-17)。

【0004】しかしながら、これらの操作を行った後、抽出操作により遺伝子を構成するDNA鎖やRNA鎖を単離する過程は、試料の汚染(コンタミネーション)を起こしやすく、しかも作業者の手作業で行うことが通常である。抽出の標準的な方法としては、クロロホルム・フェノール法がよく用いられている。しかし、クロロホルムやフェノールの毒性、廃棄物処理の手間、また遠心分離作業の手間、試料からの感染、試料への汚染が日常作業として普及する上での障害となっている。

【0005】そこで、これに代わるものとして、有機溶媒を使用しない試薬キット(たとえばQiagen社QIAprep kitなど)が市販されたり、特許が考案されている(特開平7-236499号公報、特開平9-327290号公報)。破壊工程と抽出工程を同時に行う方法もあるが、再現よく、どの試料でも純度のよい核酸や遺伝子が得られるわけではない。特に細菌の遺伝子を抽出するには、厚い細胞壁を破壊し、遺伝子と複合体を形成している蛋白質などを遺伝子から分離する必要がある。

【0006】そこで、微生物や細胞を破壊し、遺伝子を遊離させる工程と得られた遺伝子を抽出する工程とを組み合わせて行うほうが一般的であり、確実である。しかし、従来の方法は、破壊・遊離の工程と抽出分離の工程がそれぞれ別個に行われており、前処理として遺伝子の分離、抽出を一貫して行うことができないため、両工程間で試料からの感染、試料への汚染の可能性が付きまとう。またこの操作に人手を要するため、効率が悪く、コストがかさむ。また作業者への病原体の感染の可能性がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかるに、上記従来技術では、手作業による試料間の相互汚染が起きやすく、信頼性に劣ることがあり、診断を誤る可能性がある。また人手に頼るため、作業者の拘束時間が非常に長くなることが多い。そこで、試料間の汚染、作業者・作業環境からの汚染、作業者への感染予防のためには、破壊する工程と、抽出する工程を一連の連続過程に組み込み、さらに試料の移動、分注を、閉鎖された装置内で自動的に行うことで解決できると考えた。このような課題の具体的な実現装置をさらに検討した結果、本発明を考案するに至ったものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明では試料中の細菌やウイルスを溶解させ、遺伝子や核酸の断片を遊離させるようにして、さらにこれらを固体表面に付着させ、その後溶出させる工程を自動化することを考案した。上記細菌やウイルスの遺伝子を囲んでいる細胞壁や膜の溶解、破壊を「溶菌」と表わすことにして、この溶菌工程と遺伝子を単離する工程(以下「抽出」工程と表わ

す。)とを連続的に、また装置中で行わせることにした。「溶菌」の工程は、従来公知の技術(新生物化学実験のてびき3「核酸の分離・分析と遺伝子実験法」下西康嗣ほか編、化学同人1996年刊、pp. 1-17)を応用することができ、ヒータ加熱、超音波振動、マイクロ波加熱、酵素溶解、界面活性剤溶解などが適用できる。溶菌工程と抽出工程を装置上の別の連続した隣接区域で行い、各試料容器、溶菌試料容器の周囲に囲いを設けることにより、工程間の汚染による誤りを防止する。

【0009】また外気からの遺伝子などの混入を防ぐために、装置は動作中、扉により外界からの空気の流入を遮断するようにした。試料の容器間の移動には未使用の通気性フィルタ内蔵のディスポーザブルチップを用い、汚染を防ぐようにした。汚染は作業者の身体、呼吸気、装置内外の空気、試料、廃棄物などからも起きるので、工程の区域分けを行い、さらに隔壁を各試料容器に設けることで、汚染は減少する。

【0010】また最終精製試料をフタで密閉できる容器に入れることで、抽出後の汚染を防ぐ。なお、装置内の表面からの汚染を減らすために、紫外線ランプなどによる殺菌機能を備えることも有効である。また装置内の空気流れを制限するために、弱く内部空気を吸引排気することも有効である。

【0011】即ち、(溶菌)の工程は試料中の微生物や細胞を破壊する工程であり、遺伝子であるDNAやRNAをその周囲の蛋白質や細胞内小器官などの不要な物質から遊離させるために行う。これによりDNAやRNAを遊離した鎖状に変化させ、抽出を容易にさせる。試料容器は溶菌方法に適した構造とし、使い捨てのプラスチックにして、破壊や溶解を行いうる材質とする。

【0012】遺伝子の吸着が起きにくい疎水性の材料が好ましいが、特に限定されない。試料容器を設置するトレイは、各試料容器を仕切るような隔壁を設けることで試料間のエアロゾルによる汚染(コンタミネーション)を減少できる。特に吸引ノズル方式の分注の場合、ノズル先端の上下移動時にエアロゾルを生じ易い。

【0013】(抽出)工程は、遺伝子や核酸を共存する不要な物質から分離する工程であり、遺伝子を選択的に吸着できる担体を使用し、分離を行う。抽出時にも試料間のエアロゾルによる汚染が起きやすいので、試料容器間の隔壁を設けることが有効である。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明を実施例に基づいて説明する。

【0015】(実施例1)図1に本発明に基づく前処理装置の構成例を示す。また図2には、本実施例の装置での前処理過程を示した。本実施例での前処理装置の主な工程は次のとおりである。試料を試料チューブ6に入れた後、試料トレイ5に設置する。試料を全部設置した後、前処理装置のカバーを密閉し、前処理工程を開始す

る。試料は分注アーム4に組み込んだ分注ノズルで一定量吸引され、溶菌用試料チューブ7に導入される。

【0016】分注アーム4は図中の水平方向および上下方向に、移動用レール10に沿って自在に移動でき、さらに分注ノズルを上げ下げできる。分注ノズルの先端にはディスポーザブルの通気フィルタ内蔵チップが装着されており、試料ごとに交換される。溶菌用試料チューブ7に移された試料に溶菌用試薬を分注ノズルで添加する。

10 【0017】以下に磁性粒子を用いた実施例を記載するが、本発明はこの方式に限定されない。試薬を添加した溶菌用試料チューブ7を一定時間保持し、次に再びディスポーザブルの通気フィルタ内蔵チップを装着した分注ノズルで、抽出用試料チューブ8に試料を移す。この試料に石英で被覆した磁性微粒子を一定量加え、さらにカオトロピック試薬(たとえば、4Mグアジニイソチオシアン酸塩溶液)を加える。この磁性微粒子を下方に設置してある永久磁石を上昇させ、チューブの底に密着させ、チューブ底に集める。

20 【0018】次にディスポーザブルのピペットチップを装着した分注ノズルを用いて洗浄液(5Mグアジニイソチオシアン酸塩溶液、50mM トリス塩酸緩衝液(pH6.4))を分注して洗浄し、最後に滅菌純水を少量試料チューブ8に加え、石英表面に吸着しているDNAを溶離させる。溶離したDNAをディスポーザブルの通気フィルタ内蔵チップで吸い上げ、抽出核酸用チューブ9に移す。

30 【0019】このようにして得たDNAを各分析法に供する。遺伝子や核酸の吸着には、石英やガラスがよく用いられており、磁性粒子だけでなく、石英やガラスの粒子単独担体でも同様に利用できる。この場合、粒子がノズルチップで除去されないように粒子径をチップの先端口径より大きくした。遺伝子や核酸の抽出に際しては、特定の遺伝子配列に特異的な核酸プローブを固定した粒子や材料表面を用いることもできる。

40 【0020】各試料および核酸試料のチューブの上端は図3に示すように、四方をトレイの隔壁14が囲んでおり、試料間の汚染(コンタミネーション)を低減させるようにしてある。試料チューブはフタ付きのものでもかまわないが、分注の障害になりやすいので、最後に精製済みの試料にフタをかぶせるほうが自動化の方法には適している。RNAの抽出は特にRNA分解酵素が至るところに存在するので、酵素の活性阻害剤などの添加操作が必要である。

【0021】溶菌の工程は、本実施例ではリゾチーム溶液で処理した後、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)-NaOH溶液を添加する方式を採り、大腸菌のDNAを回収することができた。溶菌操作には他の方法も同様に適用でき、図4に示すように、加温水を溶菌試料トレイの下方に設置し、電熱ヒータ19で煮沸する方法も適用

できる。

【0022】超音波の場合には、素子を水槽の底に設置し、溶菌できるようにする。またマイクロ波の場合には、マイクロ波発生器を溶菌区域の上方に設置し、溶菌できるようにする。溶菌に用いる方法は遺伝子や核酸の切断や分解を引き起こさないような手法であれば、上記の方法に限定されることはない。

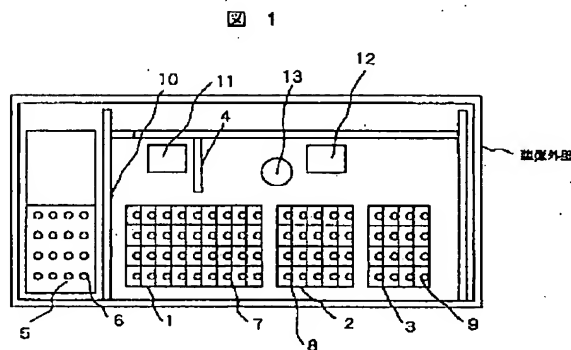
【0023】装置内部に紫外線ランプ（波長254nm付近を最も強く放射するUV灯）を設置しておき、前処理操作前後に装置内の殺菌と汚染遺伝子のUV光による破損を行うと、さらに汚染を防ぐのに有効である。

【0024】

【発明の効果】本発明により、遺伝子や核酸を含む生体試料からの遺伝子や核酸の分離を、容易に自動的に行うことができる。特に試料への周囲環境、他の試料からの汚染を防止でき、高品質の核酸や遺伝子を得ることができる。また試料から作業への病原体の感染を防ぐことができる。

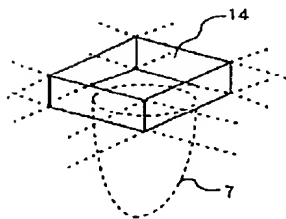
*

【図1】



【図3】

図 3



*【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例の前処理装置の上から見た平面構成概略図である。

【図2】本発明の前処理装置の前処理過程の流れを示す図である。

【図3】本発明による試料チューブの設置状態を示す模式図である。

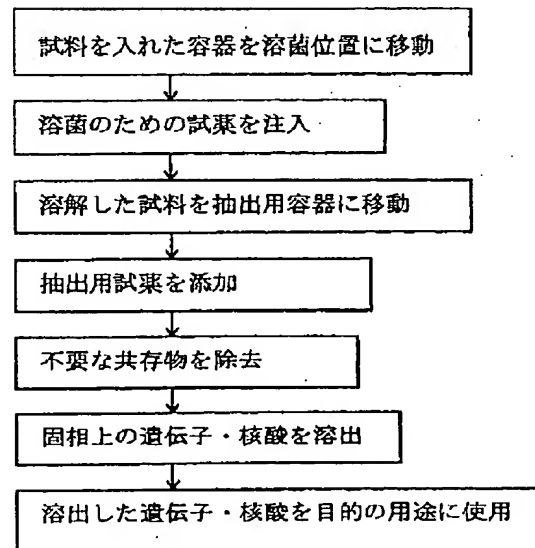
【図4】本発明による試料の溶菌工程の一別法による実施例の模式図である。

10 【符号の説明】

1…溶菌用試料トレイ、2…抽出用試料トレイ、3…精製試料用トレイ、4…分注アーム、5…試料用トレイ、6…試料チューブ、7…溶菌用試料チューブ、8…抽出用試料チューブ、9…精製試料用試料チューブ、10…分注アーム移動用レール、11…溶菌用試薬ボトル、12…抽出用試薬ボトル、13…分注ノズルチップ廃棄口、14…チューブ隔壁、15…トレイプレート、16…加温水、17…試料溶液、18…加熱ヒータ。

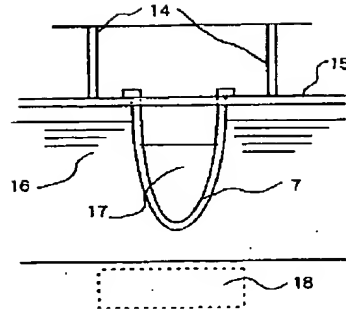
【図2】

図 2



【図4】

図 4



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成13年11月9日(2001.11.9)

【公開番号】特開平11-271193

【公開日】平成11年10月5日(1999.10.5)

【年通号数】公開特許公報11-2712

【出願番号】特願平10-76976

【国際特許分類第7版】

G11B 7/24 538

501

511

534

535

561

563

B41M 5/26

G01N 1/28

1/10

// G01N 33/48

【F1】

G11B 7/24 538 C

538 E

538 F

501 Z

511

534 G

G01N 1/28 J

1/10 A

33/48 A

【手続補正書】

【提出日】平成13年3月22日(2001.3.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】 生体試料前処理方法及びその装置

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】微生物菌体や細胞を破壊して、生体試料中の遺伝子や核酸を遊離させる第1の工程と、遊離した該

遺伝子や該核酸を共存物から分離する第2の工程を含む生体試料前処理方法であって、上記第1の工程及び上記第2の工程を外界からの空気の流入を防ぐ扉によって遮断された区画内で行い、かつ上記第1の工程後、上記第2の工程を、上記第1の工程とは仕切られた別の区画において行うことを特徴とする生体試料前処理方法。

【請求項2】生体試料が体液であることを特徴とする請求項1記載の生体試料前処理方法。

【請求項3】上記第1の工程を行う区画と、上記第2の工程を行う区画とを隣接させることを特徴とする請求項1記載の生体試料前処理方法。

【請求項4】上記第1の工程で使用した容器から、上記第2の工程で使用する容器に試料を移し替えることを特徴とする請求項1記載の生体試料前処理方法。

【請求項5】上記第1の工程をヒータ加熱、超音波振動、マイクロ波加熱、酵素溶解及び界面活性剤溶解のい

ずれかによって行うことを特徴とする請求項1記載の生体試料前処理方法。

【請求項6】生体試料中の遺伝子や核酸を、微生物菌体や細胞を破壊して遊離させる装置を設置する区画と、遊離した該遺伝子や該核酸を共存物から分離する装置を設置した区画と、両区画間の空気の流通を遮断する扉と、上記両区画に外界からの空気の流入を防ぐ扉を備えることを特徴とする生体試料前処理装置。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正内容】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は血液や体液中などの生体試料前処理方法及びそれに用いられる装置に関する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.